

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(51) 国際特許分類7 C12N 15/00, 9/04, 1/21, C09B 67/00 // (C12N 15/00, C12R 1:645) (C12N 9/04, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12N 9/04, C12R 1:645)	A1	(11) 国際公開番号 WO00/50582 (43) 国際公開日 2000年8月31日(31.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01093 (22) 国際出願日 2000年2月25日(25.02.00) (30) 優先権データ 特願平11/50562 1999年2月26日(26.02.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 明治製菓株式会社(MEIJ SEIKA KAISHA LTD.)(JP/JP) 〒104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 正田 誠(SYODA, Makoto)(JP/JP) 〒225-0024 神奈川県横浜市青葉区市ヶ尾町1062-1 ローゼ市ヶ尾406 Kanagawa, (JP) 菅野靖史(SUGANO, Yasushi)(JP/JP) 〒222-0022 神奈川県横浜市港北区篠原東3-17-3 Kanagawa, (JP) 窪田英俊(KUBOTA, Hidetoshi)(JP/JP) 〒350-0214 埼玉県坂戸市千代田五丁目3番1号 明治製菓株式会社 生物科学研究所内 Saitama, (JP)		(74) 代理人 弁理士 久保田藤郎, 外(KUBOTA, Fujio et al.) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目3番12号E-1ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: NOVEL ENZYME HAVING DECOLORING ACTIVITY AND METHOD FOR DECOLORING DYES BY USING THE SAME (54)発明の名称 脱色活性を有する新規酵素及びこれを用いた染料の脱色方法 (57) Abstract A novel peroxidase having a high dye-decomposition activity; its genetic information; and a method for decomposing and decoloring dyes by using the same. Thus, various dyes over a broad range can be efficiently decomposed and decolorized without causing problems such as secondary contamination due to the formation of toxic by-products and discharge of greenhouse gas in association with the consumption of much energy. The above-described enzyme can be supplied in a large amount on the basis of its genetic information, which makes it possible to utilize the enzyme in, for example, treating waste dye solutions in the field of dyeing industry, etc.		

(57)要約

本発明は、染料に対して高い分解活性を有する新規なパーオキシダーゼ酵素、その遺伝的情報及びこれを用いた染料の分解・脱色方法に関するものである。これにより、有害な副産物の生成による二次汚染や、高度のエネルギー消費による温室ガスの排出を伴うなどの問題点を有さず、しかも効率的で広範囲の種類の染料の分解・脱色が可能となった。

また、本発明においては、遺伝的情報に基づいて本酵素を大量に供給することが可能となり、染色工業等の分野における染料廃液の処理等に活用することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ		共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

脱色活性を有する新規酵素及びこれを用いた染料の脱色方法

技術分野

本発明は、染料に対して高い分解活性を有する新規なパーオキシダーゼ酵素、その遺伝的情報及びこれを用いた染料の分解・脱色方法を提供するものである。

背景技術

繊維製品の染色や染料製造の工程から排出される各種の合成染料は、自然界での分解が難しい難分解性物質が多い。これらの有色廃液は、自然界にとって有害であることから、その廃水に対する規制が強化されている。

従来、染色工業、染料製造工業の分野における染料廃液の処理は、主に吸着、濃縮、化学的変換、焼却などの物理的もしくは化学的な方法により行っている。しかしながら、これらの処理方法は効率的である反面、有害な副産物の生成による二次汚染や、高度のエネルギー消費による温室ガスの排出を伴うなどの問題点があった。

近年、上記の処理方法に代わるものとして、微生物や酵素などバイオテクノロジーを活用した処理方法が注目を集めており、既に染料や有色物質を分解できるいくつかの菌株も報告されている。例えば、リグニン分解菌として知られる白色腐朽菌の一種ファネロカエテ・クリソスポリウムを挙げることができる。

しかしながら、これまでに知られる染料分解菌は、いずれも一種類もしくは数種類の染料の分解活性しか持ち合わせておらず、その染料分解

処理能力には自ずと限界があった。それ故、染料廃液の効率的な処理方法の開発が望まれている。

既に本発明者の一部は、アゾ系及びアントラキノン系に属する染料を分解できる微生物、ゲオトリクム・カンジダム (Geotrichum andidum) Dec 1 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託されており(平成12年2月17日に原寄託(FERM P-15348)より移管)、その寄託番号はFERM BP-7033である。)を天然界より単離し、微生物処理によるより広範な染料分解・脱色方法を開発した(特開平9-173051号公報)。

このゲオトリクム・カンジダム Dec 1株の優れた染料分解能は、該菌株の有するパーオキシダーゼ酵素活性に基づくものとの推定はされていたが、そのような酵素を具体的に単離・同定した例はなく、その遺伝的情報については全く解明されていなかった。

本発明は、上記した産業上の要請に鑑みなされたものであり、より効率的な染料廃液の処理を行うために利用できる酵素及び該酵素を用いた染料の分解・脱色方法を提供することを課題としている。

先述のゲオトリクム・カンジダム Dec 1株は、広汎な染料分解活性を示すと共に、顕著な酵素安定性を有していることから、本菌株をそのまま、もしくは適当な担体に担持して染料の分解に利用することが可能である。

しかしながら、産業上の利用性をより高めるためには、染料廃液の処理、特に染料の分解を効率よく経済的に達成することが必要である。

このためには、微生物をそのまま利用するよりも、該微生物の有する染料分解酵素を単離・精製して使用すること、さらにその遺伝的構造を解明し、該酵素の大量生産を実現すること並びにこれらを組み合わせて

用いることが有用である。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、前記の新規糸状菌であるゲオトリクム・カンジダム Dec 1 株が種々の染料に対し広汎な脱色スペクトラムを示すことから、本菌の生産する染料分解酵素に着目し、研究を重ね該酵素の一つを単離・同定し、さらに本酵素をコードする遺伝子の解明と大量発現系の開発に成功した。

発明の開示

第1の本発明は、ゲオトリクム・カンジダム (Geotrichum candidum) Dec 1 (FERM BP-7033) に由来し、下記の性質を有するパーオキシダーゼ酵素（以下、DyPと略することがある。）である。

- a) 染料を分解・脱色する性質を有する
- b) SDS-PAGEを用いる分子量評価で分子量 60 kDa を示す
- c) ゲルろ過法を用いる分子量評価で分子量 55 kDa を示す
- d) 等電点電気泳動法による評価で pI (等電点) 3.8 を示す

第2の本発明は、配列表の配列番号7記載のアミノ酸配列を有する請求の範囲第1項記載の酵素である。

第3の本発明は、配列表の配列番号8記載のDNA配列を有し、請求の範囲第1項記載の酵素をコードする遺伝子である。

第4の本発明は、請求の範囲第3項記載のコード遺伝子を含む発現プラスミドベクターである。

第5の本発明は、請求の範囲第4項記載の発現プラスミドベクターにより形質転換された微生物である。

第6の本発明は、染料を分解・脱色するにあたり、請求の範囲第1項記載の酵素又は請求の範囲第5項記載の微生物を用いることを特徴とす

る染料の分解・脱色方法である。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の酵素DyPのSDS電気泳動の結果を示したものである。図中、左側の数字は分子量を示し、上側の数字は1～5のそれぞれが分子量マーカー、粗酵素液、イオン交換クロマトグラフィー通過後の酵素液、疎水クロマトグラフィー通過後の酵素液及びイオン交換クロマトグラフィー通過後の酵素液を示す。

第2図は、本発明の酵素DyPの等電点電気泳動の結果を示したものである。図中、右側の数字は等電点(pI)を示し、上側の数字は、1～3のそれぞれが粗酵素液、精製DyP、等電点マーカーを示す。

第3図は、本発明の酵素DyPの酵素活性と温度との関係を示すグラフである。

第4図は、活性中心に位置するアルギニン(Arg)残基、ヒスチジン(His)残基近傍の一次構造を比較したものである。図中、□は近位Arg残基、○は近位His残基、●は遠位His残基の位置を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明について詳述する。

本発明のパーオキシダーゼは、ゲオトリクム・カンジダム Dec 1株に由来するものである。本発明者らは、以下のようにして本酵素の単離・精製を行った。

[培養液の調製]

常法に従いゲオトリクム・カンジダム Dec 1 (FERM BP-7033) 株を液体培地にて培養した。液体培地は、ゲオトリクム・カンジダム Dec 1株が増殖できる液体培地であれば、どのような組成のもの

でも用いることができる。好適な一例として、D i f c o社製 Potato Dextrose 培地（以下、P Dと略すことがある。）を挙げることができる。また、目的とする酵素の誘導を促進するために、培地に染料を添加することもできる。

本菌株の培養条件は、用いる培地の種類等を考慮して決めればよいが、例えばP D培地を採用する場合、15～37℃、好ましくは30℃で3～8日間培養する。

こうして得られた培養液を、染料分解酵素精製原料として、以下の工程に供する。

[染料分解酵素の精製]

染料分解酵素の精製を行う。精製の条件は特に限定されないが、培養液の取扱いは、酵素活性の失活を防ぐ目的から低温下とすることが好ましく、特に冷蔵庫中で行うことが好ましい。

具体的には、まず、培養液より菌体を分離し上清を得る。この際、ろ過、遠心分離、膜ろ過などの分離方法を用いることができるが、好ましくは遠心分離を行って菌体を除去したのち、さらにガラスフィルターろ過を行う。これらの組み合わせにより、夾雑する多糖類を除き純度の高い粗酵素液を得ることができる。

得られる粗酵素液については、続けて後述の染料分解活性を指標とした単離を行ってもよいが、その前に該分離を容易にするための濃縮・脱塩を行い、濃縮粗酵素液とすることも可能である。

濃縮は、通常用いられる方法、例えば限外ろ過濃縮、塩析、エバポレーション等によることができるが、好ましくは限外ろ過濃縮により行うことができる。また、脱塩は透析、限外ろ過、電気透析法などによることが可能である。

次に、得られた濃縮粗酵素液から、目的とする染料分解酵素を染料分

解活性を指標とし単離することができる。

方法としては、イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィー、疎水カラムクロマトグラフィー、ゲルフィルトレーションカラムクロマトグラフィーなどを用いることができる。

これらのカラムクロマトグラフィーの1種類、もしくはいくつかを組合せて使用し、活性画分を集めて染料分解酵素を単離・精製することができる。

以上の操作より、本発明者らは目的とする精製酵素を得た。この精製酵素（205倍活性品）は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（以下、SDS-PAGEと称することがある。）で単一のバンドを示す。この酵素が、請求の範囲第1項記載の本発明の染料分解酵素、パーオキシダーゼである。本発明者らは、この酵素をDyPと命名した。

[精製染料分解酵素DyPの性質]

上記の操作により精製された本発明の酵素であるDyPの性質を下記要領で測定した。

まず、分子量をSDS-PAGE及びゲルろ過クロマトグラフィーにより測定した。

SDS-PAGEによる測定においては、分子量標品として市販の電気泳動用分子量標準キットを使用できる。

その一例として、ベーリンガー・マンハイム・山之内社製 Combithek が挙げられる。本キットは、 α -2-マクログロブリン（分子量170 kDa）、ホスホリラーゼB（分子量97.4 kDa）、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（分子量55.4 kDa）、乳酸デヒドロゲナーゼ（分子量36.5 kDa）、トリプシンインヒビター（分子量20.1 kDa）よりなる。

測定の結果、第1図に示すように、本発明の酵素DyPの分子量は、

60 kDaであることが示された。

また、ゲルろ過クロマトグラフィーによる本酵素の分子量評価にあたり、本発明者らはSephacryl S-200カラム、標準分子量蛋白（BIO-RAD社製）を使用して行った。

この結果、本発明の酵素DyPの分子量は、55 kDaと評価された。

次に、本発明の酵素の等電点についても測定した。等電点の測定は等電点電気泳動法 (isoelectric point electrophoresis)により行った。

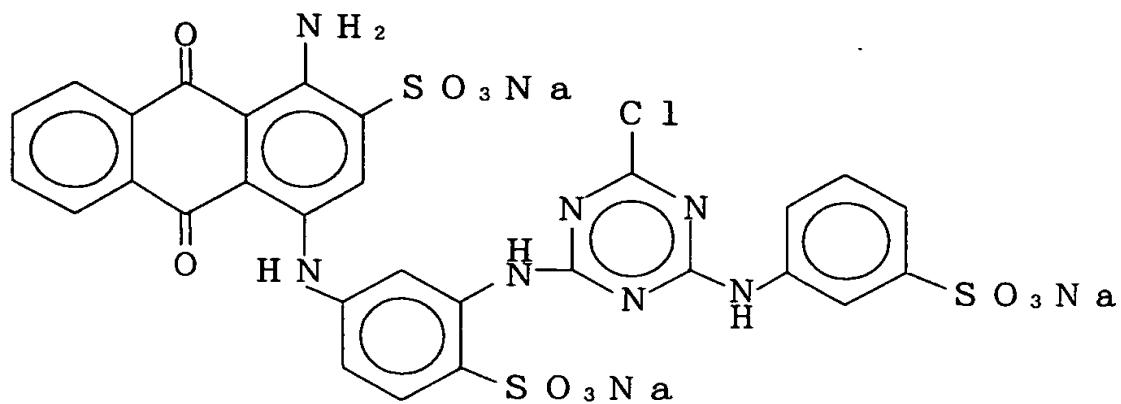
その結果、本酵素DyPの等電点は、第2図に示す如く、 $pI = 3.8$ と評価された。

[染料分解酵素DyPの染料分解スペクトラム]

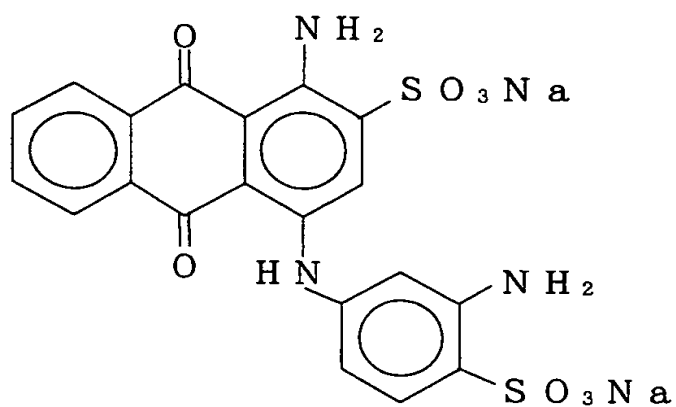
本発明の染料分解酵素DyPは、染料のうち、特にアゾ系及びアントラキノン系の染料に対し酵素活性を有し、これらの色素の分解及び脱色能を有する。

アントラキノン系染料としては、例えば Reactive blue 5, Reactive blue 19, Reactive blue 114 (いずれも日本化薬(株)製)、1-amino-4-(3-amino-4-sodium-sulfonoanilino)-2-sodium anthraquinone sulfonate (以下、AQ-1と略すことがある。)及び1-amino-4-methylamino-2-sodium-anthraquinone sulfonate (以下、AQ-2と略すことがある。)等を挙げることができる。

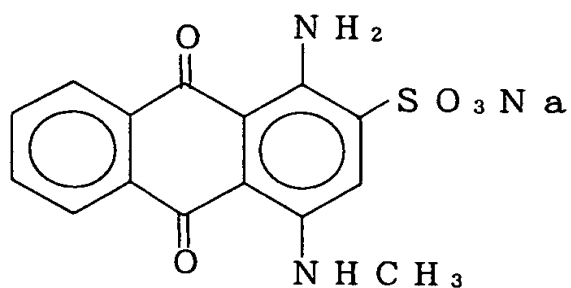
ここで、Reactive blue 5は、以下の化学式で表される化合物である。



AQ-1は、以下の化学式で表される化合物である。



AQ-2は、以下の化学式で表される化合物である。



また、アゾ系染料としては、例えば Reactive black 5, Reactive

red 33, Reactive yellow 2, Reactive blue 182 (いずれも日本化薬(株) 製) 等を挙げることができる。

上記染料のほか、染料分解酵素 D y P は、マンガンパーオキシダーゼ (以下、M n P と略すことがある。) の基質として知られている 2, 6-Dimethoxyphenol や Guaiacol などのフェノール性化合物に対する分解能をも有している。しかし、後記の実施例に示すように、反応液へのマンガン化合物の添加による酵素活性の促進効果は認められない。

一方、D y P はリグニンパーオキシダーゼ (以下、L i P と略すことがある。) の基質として知られている Veratryl alcohol との反応は認められない。

このように D y P は、驚くべきことに、従来より知られている M n P、L i P とは異なる基質特異性を示すことから、既知の酵素とは別種のパーオキシダーゼであると言える。

[染料分解酵素 D y P の反応至適温度]

本発明の染料分解酵素 D y P の反応至適温度は、第 3 図に示したように、30℃付近であり、15℃～35℃の温度範囲で安定した染料分解活性を示す。しかし、35℃以上の温度で酵素活性は急速に低下する。

[染料分解酵素 D y P の温度安定性]

本発明の染料分解酵素 D y P を所定温度で一定期間保存し、その後の活性残存率を評価した。具体的には、染料分解酵素 D y P の 25 mM クエン酸緩衝液溶液を 30℃又は 40℃で 14 日間保存した。

その結果、D y P の残存酵素活性は、30℃で保存の場合 63%、40℃で保存の場合 41%である。

温度安定性を他のパーオキシダーゼと比較するため、市販のホースラディッシュパーオキシダーゼ (和光純薬製、以下、H R P と略すことがある。) を対照とし、各酵素の 25 mM クエン酸緩衝液を 60℃で

3 時間保存後の残存酵素活性を比較した。

その結果、本発明の染料分解酵素 D y P は 6 5 % の活性が残るが、H R P は僅かに 1 0 % の活性しか残らないことが分かった。

この結果は、染料分解酵素 D y P が、これまでに知られているパーオキシダーゼに比べ、熱安定性に優れていることを示すものである。

以上に、本発明に係る新規染料分解酵素 D y P の酵素的特徴を述べた。

本発明の染料分解酵素 D y P は、従来報告されているいずれの染料分解酵素に比較して広汎な染料分解活性を示すと共に、顕著な酵素安定性を有していることが、上述の酵素特性から明白である。

したがって、請求の範囲第 6 項記載の本発明のように、染料分解酵素 D y P を用いることによって、染料の分解・脱色を効率よく行うことが可能である。

染料分解酵素 D y P の産業上の利用性を高めるためには、効率的な染料廃液や染料の分解を経済的に達成することが必要である。

その一例として、D y P を固定化して用いる方法がある。D y P を固定化用担体、例えばイオン交換樹脂、合成高分子ゲル、天然由来の活性炭、ゼオライトなどへ吸着、共有結合を介し固定化し、これをバイオリアクターとして用いる方法が考えられる。この方法によれば、微生物自体を固定化して用いるよりも、より高活性のバイオリアクターの創出に有用である。

さらに、酵素をより経済的に製造する手段として、目的酵素のコード遺伝子を単離し、該酵素を大量発現可能な宿主微生物に導入すれば、さらに効率よく、かつ純度の高い D y P を大量に、しかも安定的に得ることが可能である。

これらを組合せることにより、微生物自体を使用する場合に比べて、格段にコストパフォーマンスに優れたバイオリアクターの調製が可能と

なる。

[染料分解酵素 D y P コード遺伝子の単離の概略]

上記の観点から、本発明者らは、本発明の D y P の遺伝的情報を得るべく、以下の操作を行った。

具体的な遺伝子単離に向けての方法の概略は、以下の通りである。

最初に、先述の方法により精製した本発明の染料分解酵素である D y P に、トリプシン（和光純薬（株）社製）を作用させ、部分加水分解を行った。

得られた 5 種類の部分加水分解フラグメントを精製し、各フラグメントのアミノ酸配列を決定した後、各アミノ酸配列に対応するコード遺伝子を合成した。

この後、得られたコード遺伝子をプライマーとし、ゲオトリクム・カンジダム由来の c D N A をテンプレート遺伝子として用いて P C R 法を行い、P C R 増幅遺伝子を得た。

得られた増幅遺伝子を、D I G ラベリング検出キット（ベーリンガーマンハイム社製）を用いてラベル化した。

このラベルした増幅遺伝子をプローブとして用い、常法により、ラムダファージ λ g t 10 を用いて作成されたゲオトリクム・カンジダム Dec 1 由来 c D N A ライブラリーとのブランクハイブリダイゼーションを行った。

このようにして得られたいくつかのハイブリダイズしたコロニーより、目的遺伝子を切り出し、p U C 18 プラスミドに組み込み、こののちシーケンシングを行った。これを、以下の P C R におけるテンプレートとして用いた。

[染料分解酵素 D y P の部分アミノ酸配列の決定]

D y P コード遺伝子プライマーの作成を行うため、D y P の精製を行

った。

D y P の精製は、通常用いられる方法により行うことができ、例えば S D S - P A G E ゲルよりエレクトロブロッティング法を用いて精製する方法や、高速液体クロマトグラフィー (H P L C) 法により精製する方法等を挙げることができる。

精製された D y P は、通常の方法により変性させた後、トリプシンを用い部分加水分解を行ったのち、部分消化ペプチドを H P L C 法を用いて分画した。この結果、5つのフラグメントを得ることができた。各々のフラグメントは、エドマン法によるプロテインシーケンサーによりアミノ酸配列を決定した。得られた5つのフラグメントのアミノ酸配列のうち1番目の配列は Trp Lys であり、2番目以降のアミノ酸配列は配列表に示した通りであり、2番目は配列番号1に、3番目は配列番号2に、4番目は配列番号3に、5番目は配列番号4にそれぞれ示してある。

これらのアミノ酸配列のうち、配列番号3の一部の配列 (配列番号5) 及び配列番号4の一部の配列 (配列番号6) を P C R プライマーとして選択した。

[プローブの調製]

以下の方法により、上記2種類のアミノ酸配列をコードする D N A を合成し調製した。

得られたプライマー遺伝子を用い、ゲオトリクム・カンジダム Dec 1 の c D N A を P C R のテンプレートとして用いて、P C R 法により第一段階の遺伝子増幅を実施した。その結果、2つのプライマーに対応する 200 b p の新たなプライマーが得られた。

プライマーの両末端に、T 4 D N A ポリメラーゼ処理を行い、プラスミド連結部位を合成した。次に、大腸菌 (E. coli) 発現ベクターであ

る pUC18 の HincII サイトにライゲーションを行い、リコンビナントプラスミドを得た。

本組み換えプラスミドを、大腸菌 JM 109 株を用いて増幅し、得られたプラスミドよりコード遺伝子を切り出した後、第 2 回目の PCR により得られた DNA シーケンスを決定した（後記の配列表の配列番号 8 の 1012～1181 番目参照）。

〔染料分解酵素 DyP コード遺伝子 DyP のクローニング〕

別途培養されたゲオトリクム・カンジダム Dec 1 株より、通常の方法に従い RNA を調製した。得られた RNA よりポリ (A) + RNA を精製した。この後、得られたポリ (A) + RNA を用い、cDNA キット（タカラ（株）社製）により cDNA を得た。

得られた cDNA について、T4 ポリヌクレオチドキナーゼキットを用いライゲーションを行った後、1200～2000 bp の DNA を電気泳動により分画した。

さらに、ラムダファージ λ gt10 の EcoRI サイトに導入し、ラムダファージにバックグating した。得られたファージを大腸菌に感染させた。

先に調製したラベル化プローブとハイブリダイズするコロニーをスクリーニングした。この結果、11 の候補株を得た。

先の測定結果より、本発明の DyP の分子量は 60 kDa、糖鎖を 17% 含有することから、アミノ酸一次配列は 49.8 kDa と見積もられる。また、DyP コード遺伝子のオープンリーディングフレームは 460 アミノ酸、即ち 1380 bp と見積もられる。

得られた 11 の候補株のコード遺伝子を用いてそれぞれ再度 PCR を行い、導入 cDNA のフラグメントサイズを評価、すなわち 1380 bp 近傍の遺伝子の検索を行った。

この結果、1600bpのサイズのcDNAを有するクローン92を得た。本cDNAを、組み換えプラスミドよりBamHIを用いて切り出し、pUC18に組み込み、得られたプラスミドをpB92とした。本クローン92は染料分解酵素DyPに基づく染料分解活性が確認された。

[pB92遺伝子のDNA配列]

pB92のシーケンシングはDNAシーケンサーを用いた。この結果、pB92のオープンリーディングフレームは1494bp、498アミノ酸よりなること、さらに、その分子量は53306であることが判明した。

このことは、pB92がDyP遺伝子を有することを示すものである。pB92の有するDyPのアミノ酸配列及びDyP遺伝子の塩基配列を、それぞれ配列表の配列番号7及び8に示す。すなわち、配列表の配列番号7記載のアミノ酸配列を有するDyPが請求の範囲第2項記載の本発明の酵素であり、配列表の配列番号8記載の塩基配列を有する遺伝子が、請求の範囲第3項記載の本発明の遺伝子である。

なお、請求の範囲第3項記載の本発明の遺伝子（配列表の配列番号8参照）において、配列の一部に欠失、置換、付加等がなされたものであっても、本発明の遺伝子と同様の効果を有している限り、本発明の範囲内である。

また、これらの遺伝子を有するプラスミドベクターであるpB92が請求の範囲第4項記載の本発明である。

さらに、pB92を大腸菌に形質転換して得られる形質転換体が請求の範囲第5項記載の本発明である。この形質転換体を用いれば、本発明の染料分解酵素DyPを効率よく生産することができる。

以下において、本発明を実施例により具体的に説明する。但し、本発

明は実施例により限定されるものではない。

実施例 1（染料分解酵素 D y P の精製及び性質）

[染料分解酵素 D y P の精製]

150 mL の P D 培地（ポテトデキストロース培地、D i f c o 社製）を 500 mL 容のエルレンマイヤーフラスコに仕込み、ゲオトリクム・カンジダム Dec 1（F E R M B P - 7 0 3 3）株の孢子懸濁液 5 mL を接種して培養を開始した。培養は 30 °C、120 r p m で 6 日間行った。

培養後、培養液を 4 °C に冷却した後、7200 × g、20 分間の遠心分離を行った。得られた遠心上清のうち 4380 mL を以下の操作に使用した。

遠心上清は、ガラスフィルター（G C 5 0、東洋ろ紙製）にてろ過を行い、含有されているポリサッカライドを除去した。

次いで、ろ過液はアミコン社製限外ろ過膜（Y M 1 0）を用い限外ろ過し、60 mL まで濃縮した。濃縮液を、さらに 25 mM ビペラジン緩衝液（p H 5 . 5）で透析後、アミコン社製 C e n t r i p r e p 1 0 を用い、17 . 2 mL にまで濃縮した。

濃縮液 17 . 2 mL を 25 mM ビペラジン緩衝液（p H 5 . 5）で平衡化された 2 . 8 × 6 . 0 c m の S u p e r Q 650 M カラム（トーソー社製）にチャージした。この後、200 mL の同一緩衝液で洗浄後、0 ~ 0 . 4 M のリニアグラジエントにより溶出した。

色素分解活性を示すフラクションを集め、アミコン社製 C e n t r i p r e p 1 0 を用い、2 . 8 mL まで濃縮した。濃縮液を 1 . 6 × 6 . 5 c m の 25 mM クエン酸緩衝液（p H 5 . 5）、0 . 8 M 硫酸アンモニウムで平衡化されたブチルトヨパール（トーソー社製）にチャージした。次に、50 mL の同一緩衝液で洗浄後、0 . 8 M から 0 M の硫

酸アンモニウムのリニアグラジェントにより溶出された染料分解活性を示す画分を集め、これをD y Pとした。

D y Pを25 mM クエン酸緩衝液により透析し、1.5 mgの精製D y Pを得た。精製D y P溶液は4℃で保存した。

[染料分解酵素の性質]

上記操作で得られた染料分解酵素D y Pの分子量及び等電点を測定した。

分子量については、SDS-PAGE電気泳動法及びゲルろ過法により決定した。

SDS-PAGE電気泳動には、10%のポリアクリルアミドゲルを用い、ATTO社製AE-6440電気泳動装置を使用した。また、分子量コントロールとして、ベーリンガー・マンハイム・山之内社製Combithekを用いた。

この結果、D y Pの分子量は60 kDaと評価された。

一方、ゲルろ過には、25 mM クエン酸緩衝液(pH 5.0)で平衡化された3.1×95 cmのSephacryl S-200カラムを用い、バイオラッド社製標準蛋白キットを使用した。

その結果、D y Pの分子量は55 kDaと評価された。

また、等電点電気泳動の測定には、ファルマシア社製Multiphor II 2-Dの低pIキャリブレーションキット(pH 2.5-6.5)を用いた。その結果、D y Pの等電点は3.8と評価された。

[染料分解活性の評価]

精製D y Pの染料分解スペクトラムを、9つの染料と3つのモデル化合物につき調査した。精製D y Pのこれらの染料又はモデル化合物の分解活性を、分解速度の測定により評価した。

染料としては、Reactive blue 5, 19 及び 114; A Q-1, A Q-2;

Reactive black 5, Reactive red 33, Reactive yellow 2, Reactive blue 182 を用いた。

また、モデル化合物としては、2, 6-dimethoxyphenol, Guaiacol, Veratryl alcohol を用いた。

染料分解活性の測定は、以下のようにして行った。

所定濃度 (30 ~ 120 ppm) の各染料を含有する 25 mM クエン酸緩衝液 (各染料分解至適 pH に調整) 3 mL と、1.86 nM D y P 溶液 1 mL との混合液に、0.2 ~ 0.4 mM の過酸化水素水を添加することにより酵素反応を開始した。反応は 30 °C で所定時間行い、反応速度を評価した。

染料分解活性 1 U は、1 μ mol の Reactive blue 5 または A Q - 2 を 1 分間に脱色できる活性と定義した。結果を第 1 表に示す。

第1表(D y Pの各種染料及びモデル化合物分解活性)

カラー インデックス	発色団	λ_{\max}	至適 pH	初期濃度 (ppm)	脱色活性 (ppm/min)
Reactive blue 5	AQ	600	3.2	100	19.8
Reactive blue 19	AQ	590	3.2	70	13.1
Reactive blue 114	AQ	620	4.0	100	7.8
AQ-1	AQ	600	3.2	60	5.4
AQ-2	AQ	635	3.0	50	19.5
Reactive black 5	AZ	598	3.2	30	0.1
Reactive red 33	AZ	500	3.2	50	0.4
Reactive yellow 2	AZ	390	3.2	100	0.5
Reactive blue 182	AZ	610	4.0	120	20.9

一方、モデル化合物として用いた 2, 6-dimethoxyphenol については、酸化により生ずる 470 nm の吸収を定色した。

すなわち、D y P 2.79 nM、0.2 mM の 2, 6-dimethoxyphenol と 0.2 mM の過酸化水素とを含有する 25 mM クエン酸 (pH 4.5) で反応を行った。

Guaiacol については、上記反応系の 0.2 mM 2,6-dimethoxyphenol の代わりに 1 mM の guaiacol を使用し、465 nm の吸光度を測定した。

モデル化合物についての結果を第 2 表に示した。

第 2 表 (DyP のモデル化合物分解活性)

化合物	帰属	pH	初期濃度 (mM)	酸化速度 ($\Delta OD/min$)
2,6-dimethoxyphenol	Phenolic	4.5	0.2	0.29
Guaiacol	Phenolic	4.0	1.0	0.29
Veratryl alcohol	Nonphenolic	—	0.5	ND

第 1 表の結果より、以下のことが分かる。

染料分解酵素 DyP は、アントラキノン系色素に対して高い分解活性を示す。特に、Reactive blue 5, Reactive blue 19, AQ-2 に対し、優れた分解活性を示し、これらの色素を効率よく分解できる。

また、アゾ系色素に対しても分解活性を示し、特に Reactive blue 182 を効率よく分解した。その他のアゾ系色素 Reactive black 5, Reactive red 33, Reactive yellow 2 に対しても分解能を有している。

このことから、DyP はアントラキノン系色素及びアゾ系色素を分解する作用を有することが明らかとなった。

一方、DyP のモデル化合物に対する活性は、第 2 表の結果より、以下のようであった。

まず、フェノール性水酸基を有する 2,6-dimethylphenol, Guaiacol は DyP により効率よく分解できた。一方、リグニンパーオキシダーゼ

の基質として知られる Veratryl alcohol は分解することができなかった。

このことから、D y P はフェノール性水酸基を有する化合物に対して特異的に高い酵素活性を有することが明らかとなった。

〔染料分解酵素 D y P の至適温度〕

D y P の至適温度は、Reactive blue 5 の脱色（分解）活性を所定の温度で評価して求めた。この結果を第 3 図に示す。

第 3 図より、D y P は 20 ～ 35 °C の範囲で高いパーオキシダーゼ活性を示し、至適温度は 30 °C であることが明らかである。

実施例 2 〔金属イオンの染料分解酵素 D y P 活性への影響〕

D y P 及び 100 ppm の Reactive blue 5 からなる反応液中に、カルシウム、亜鉛、銅（2 価）、カリウム、銅（1 価）、ナトリウムの各イオン 5 mM を共存させ、これらの金属イオンが D y P 酵素相対活性に与える影響を調べた。

この結果を第 3 表に示した。

第 3 表（D y P の染料分解活性への金属カチオンの影響）

金属イオン	濃度 (mM)	比活性 (%)
無添加	—	100
C a ⁺⁺	5	81
Z n ⁺⁺	5	69
C u ⁺⁺	5	75
K ⁺	5	81
N a ⁺	5	81
F e ⁺⁺	0.2	50

第3表より、上記のイオン添加時には、いずれも無添加時に比べ80%程度の相対活性を示し、特に2価鉄イオンは、0.2 mMの共存で50%活性が阻害された。

このことから、金属イオンの共存がDyPの酵素活性に悪影響を与えることが示唆された。

実施例3 (DyPをコードする遺伝子及びアミノ酸配列の決定)

[染料分解酵素DyPの部分アミノ酸配列の決定]

ゲオトリクム・カンジダム Dec 1 (FERM BP-7033) 株より、Laemmliの方法 (Laemmli, U.K. Nature(London), 227, 680-685 (1970)) に従い、SDS-PAGEに供して精製DyPを分離した。

その後、Towbinの方法 (Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354 (1979)) に従い、ポリビニルジフルオライド (以下、PVDFと略することがある。) 膜にエレクトロブロットングした。

PVDF膜をクマシーブリリアントブルー (CBB-250) 処理し、次いでDyPの染色バンド部分の膜のみを切り出し、1.5 mL容の試験管に移した。これに50 μ Lのメタノールを加え、さらに、200 μ Lの還元緩衝液 (8 M グアニジン塩酸塩、0.5 M トリス、0.3%のエチレンジアミン四酢酸2ナトリウム (EDTA-2Na)、5%のアセトニトリルを含むpH 8.5の緩衝液) を加え、ゆっくり振った後、還元緩衝液を除いた。

次に、PVDF膜上の蛋白質に、1 mgのジチオスレイトールを含む50 μ Lの還元緩衝液を加え、25°Cで1時間置いた。PVDF膜を200 mLのコニカルビーカーに移した後、100 mLの水で5分、100 mLの2%アセトニトリルで5分、100 mLの0.1% SDSで5

分各々洗浄した。

この後、P V D F膜を1.5 mL容の新しい試験管に移し、岩松の方法 (Iwamatsu, A. Electrophoresis, 13, 142-147 (1992)) に従い、500 μ Lの1 mgのメチオニンを含むポリビニルピロリドン PVP-40 (以下、PVP-40と略すことがある。)を加え、室温で30分間静置した。

さらに、P V D F膜を100 mLの10%アセトニトリル溶液で洗浄後、500 μ Lの分解緩衝液 (100 mM 重炭酸アンモニウム、10 mM 塩化カルシウム、pH 7.8) で3回洗浄し、洗液を棄てた。続いて、1 pmolのトリプシンを含むほかは上記と同様の分解緩衝液500 μ Lを添加し、25°Cで12時間酵素反応を行った。

P V D F膜より反応液に溶出したオリゴペプチドを凍結乾燥後、100 μ Lの分解緩衝液に溶解し、HPLC (カラム: Capcell-Pak C-18, 4.6 \times 150 mm) で、0.02%トリフルオロ酢酸含有イソプロピルアルコール-アセトニトリル (7:3 v/v) の0~50%の直線勾配溶出 (100分、0.8 mL/min.) で溶出し、各々のフラクションを分画した。

分画精製された部分分解ペプチドを、蛋白シーケンスシステム (シマズ PPSQ-21) により一次構造を決定した。

[cDNAライブラリーの調製]

RNAの抽出を目的として、ゲオトリクム・カンジダム Dec 1株の培養液を遠心分離して該菌株の菌糸25 mLを分離した。これを遠心管に入れ、液体窒素を添加して該菌糸を凍結させた後、12時間の凍結乾燥を行い粉末を得た。

得られた菌糸の粉末に、再び液体窒素を注ぎ菌糸を粉碎し、10 mLのグアニジウム溶液 (4 M グアニジウムイソチオシアナート、20 m

M 酢酸ナトリウム (pH 5.2)、0.1mM DTT、0.5% N-lauroylsarcosine を含有する) を添加し、ホモゲナイズした。これを遠心分離 (1500×g) して上清を得た。

得られたRNAは、塩化セシウム超遠心法 (Ullrich) により分離後、ポリ (A) + RNAをオリゴ (dT) セルロースカラムを用いて分画した。cDNAの合成は、得られたポリ (A) + RNAを用い、cDNA合成キット (タカラ (株)、Gulblier-Hoffmann) により行った。

得られたcDNAに、DNAライゲーションキットを用いてアダプター (EcoRI—NotI—BamHI) を挿入した。ライゲーションした両末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼによりリン酸化した後、アガロース電気泳動によりcDNAを分離した。

さらに、cDNAの中からDyPの分子量に見合う1200~2000bpのcDNAを分離し、8μLのTE緩衝液 (10mM トリス塩酸 (pH 8.0)、1mM EDTA—2Na) を加えて溶出した。

得られたcDNAフラグメントを、ラムダファージのEcoRIサイトにライゲーションした。これをGigapack Gold Packaging Extract (Stratagene, La Jolla Calif., USA)によりラムダファージへのパッケージングを行った。

ラムダファージλgt10は、大腸菌 E. coli NM514 株に37℃で15分間感染させたのち、LB寒天 (バクトトリブトン、0.5%バクト酵母エキス、1%食塩、1.5%寒天/1000mL) に0.7%寒天を用いて重層した。プレートは37℃で12時間培養した。

[染料分解酵素DyPのコード遺伝子のシーケンシング]

先に調製したラベル化プローブとハイブリダイズするコロニーをスクリーニングした結果、ブランク・ハイブリダイゼーションによりポジテ

イブな cDNA ライブラリー及び PCR により得られた DNA のうち、11 の候補株を得た。

これらを、T4 DNA リガーゼにより pUC18 プラスミドにライゲーションし、大腸菌 *E. coli* JM109 株で増幅した。

先述の DyP の特性の測定結果より、DyP の分子量は 60 kDa であり、糖鎖を 17% 含有することから、アミノ酸一次配列は 49.8 kDa と見積もられる。また、DyP コード遺伝子のオープンリーディングフレームは 460 アミノ酸、すなわち 1380 bp と見積もられる。

そこで、得られた候補株 11 のコード遺伝子を用いて再度 PCR を行い、導入 cDNA のうち、1380 bp 近傍の遺伝子の検索を行った。

この結果、1600 bp のサイズの cDNA を有するクローン 92 を得た。

本 cDNA を組み換えプラスミドより *Bam*HI を用いて切り出し、pUC18 に組み込み、得られたプラスミドを pB92 とした。

その後、プラスミド DNA をアルカリ抽出法で調製した。得られた両ストランドを DNA シークエンサー（モデル 4000 L、Li-Cor Inc., Lincoln, Neb., USA）で解析しシーケンスを行った。

[異種ホストでの発現]

その結果得られた pB92 のオープンリーディングフレームは 1494 bp、498 アミノ酸であり（配列表の配列番号 7 参照）、このアミノ酸数より推定される分子量は、53306 であることが判明した。このことから、上記 pB92 は DyP 遺伝子を有することが示された。

さらに、常法により pB92 を大腸菌に形質転換した。この形質転換体は日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、その受託番号は FERM B P-7032 である。この形質転換体を L 培地（酵母エキス 0.5%、

NaCl 0.5%、トリプトン 1.0%) にて培養後、集菌・破碎することにより DyP 活性を確認することができた。

[他のペルオキシダーゼ配列との比較]

DyP 遺伝子のホモロジーサーチを 3 種類のデータベース (Genebank, EMBL, DDBJ) を用い行った。この結果、DyP に相同な遺伝子として Genebank に登録された U77073 (Polyporaceae sp.) 由来のペルオキシダーゼが検索された。そこで、両者の相同性を調べた。相同性の高い領域をみると、407 番から 438 番目の領域が最も相同性が高く 88%、次いで 62 番から 85 番目の領域の相同性が 83% であったが、遺伝子の全配列においては 56% の相同性が認められたに過ぎなかった。また、上記の Polyporaceae sp. 由来のペルオキシダーゼ以外の他のペルオキシダーゼの中で高い相同性を示すものは見出されなかった。

[他のかび由来ペルオキシダーゼとの比較]

微生物のペルオキシダーゼは、植物型ペルオキシダーゼに分類されている。植物型ペルオキシダーゼの分類は、Welinder ら (Welinder, Curr. Opin. Struct. Biol., 2, 388-393(1992)) により体系付けられており、3 つのクラスに分類されている。これによれば、クラス I は、原核生物由来または真核生物のミトコンドリア由来のペルオキシダーゼ、クラス II は、真菌由来のペルオキシダーゼ、クラス III は高等植物由来のペルオキシダーゼが分類されている。

Welinder らの分類は、各ペルオキシダーゼの一次配列中共通性の高い配列を比較することにより行われる。詳しくは、活性中心に配位するヘム鉄近位 (Proximal) の His 残基及び遠位 (Distal) の His、Arg 残基近傍の一次配列を比較することにより行われる。Welinder らの作成した配列比較表を用い DyP の配列を比較した (第 4 図)。なお、第 4

図では、クラス I のペルオキシダーゼとして C C P (*Saccharomyces cerevisiae* 由来のチトクローム C パーオキシダーゼ)、E C P (*E. coli* 由来のパーオキシダーゼ) を挙げた。クラス II のペルオキシダーゼとして A R P (*Arthromyces ramosus* 由来のパーオキシダーゼ)、M n P (*Phanerochaete* 属かび由来のマンガンパーオキシダーゼ)、L i P (*Phanerochaete chrysosporium* 由来のリグニンパーオキシダーゼ) との比較を行った。また、クラス III のペルオキシダーゼとして T P (*Tunip* のパーオキシダーゼ)、H R P (ホースラディッシュパーオキシダーゼ) を掲げた。

以上から、D y P はかび由来であるため、クラス II に分類されるが、クラス II で特徴的に見られる近位 Arg 残基 (図中 : □ の位置) が存在しないこと、遠位 His 残基 (図中 : ● の位置) 近傍の配列に相同性が見出されないことが分かった。これらのことから、D y P がかび由来ペルオキシダーゼとし特異的配列を有していることが判明した。

産業上の利用可能性

本発明により、広範な種類の染料に対して高い分解活性を有するパーオキシダーゼ及び該酵素を利用した染料の分解方法が提供される。しかも、本発明は本酵素の遺伝的情報を提供し、これに基づいて本酵素を大量に供給することが可能となり、染色工業等の分野における染料廃液の処理等に活用することができる。

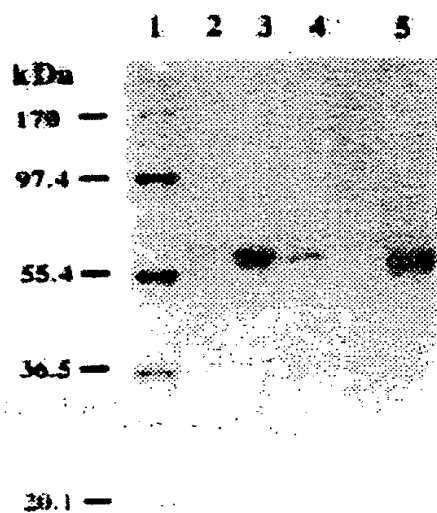
従って、染料分解酵素である本酵素を固定化することにより、より高活性のバイオリアクターとして、産業上の利用性をより高めることが可能である。

請 求 の 範 囲

1. ゲオトリクム・カンジダム (Geotrichum candidum) Dec 1 (FERM BP-7033) に由来し、下記の性質を有するパーオキシダーゼ酵素。
 - a) 染料を分解・脱色する性質を有する
 - b) SDS-PAGEを用いる分子量評価で分子量 60 kDaを示す
 - c) ゲルろ過法を用いる分子量評価で分子量 55 kDaを示す
 - d) 等電点電気泳動法による評価で pI (等電点) 3.8を示す
2. 配列表の配列番号 7 記載のアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項記載の酵素。
3. 配列表の配列番号 8 記載の DNA 配列を有し、請求の範囲第 1 項記載の酵素をコードする遺伝子。
4. 請求の範囲第 3 項記載のコード遺伝子を含む発現プラスミドベクター。
5. 請求の範囲第 4 項記載の発現プラスミドベクターにより形質転換された微生物 (FERM BP-7032)。
6. 染料を分解・脱色するにあたり、請求の範囲第 1 項記載の酵素又は請求の範囲第 5 項記載の微生物を用いることを特徴とする染料の分解・脱色方法。

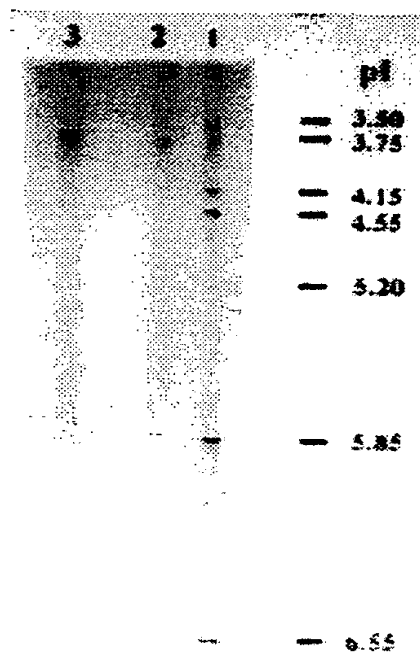
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 1 図



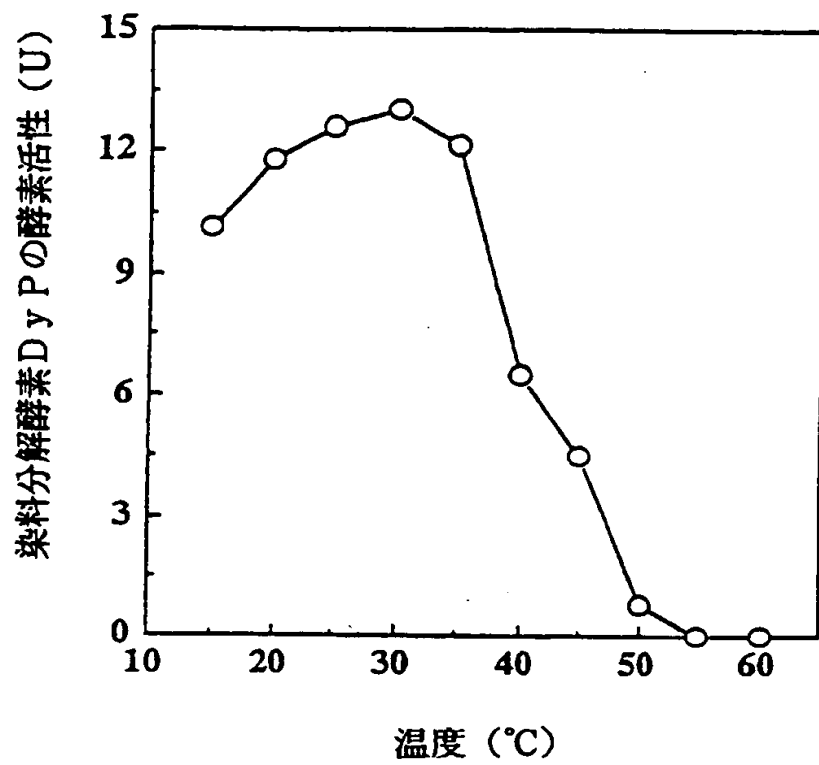
THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 2 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 3 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

第 4 図

43	CCP	Gly	Pro	Val	Arg	Leu	Ala	Trp	His	Thr	Ser	Gly	55	165	177
97													109	258	270
47	ECP	Ala	Gly	Leu	Phe	Ile	Arg	Met	Ala	Trp	His	Gly	Ala	Gly	Thr
													59	175	187
	ARP	Val	Arg	Lys	Ile	Leu	Arg	Ile	Val	Phe	His	Asp	Ala	Ile	176
37													49	164	176
	MnP	Ala	His	Glu	Val	Ile	Arg	Leu	Thr	Phe	His	Asp	Ala	Ile	179
38													50	167	179
42	LiP	Ala	His	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Val	Phe	His	Asp	Ser	Ile	175
													54	165	175
33	DyP	Gln	Ala	Pro	Leu	Pro	Thr	Leu	Thr	Gln	His	Thr	Thr	Glu	171
													45	159	171
33	TP	Gly	Ala	Ser	Ile	Leu	Arg	Leu	Phe	Phe	His	Asp	Cys	Phe	173
													45	161	173
	HAP	Ala	Ala	Ser	Ile	Ile	Arg	Leu	His	Phe	His	Asp	Cys	Phe	173
															173

THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> 明治製菓株式会社 Meiji Seika Kaisha Ltd.

<120> 脱色活性を有する新規酵素及びこれを用いた染料の脱色方法

<130> A-306

<150> JP 11/050562

<151> 1999-02-26

<160> 8

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP - 7033)

<400> 1

Thr Tyr Val Pro Glu Arg

1

5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP - 7033)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 2

Cys Pro Phe Gly Ala His Val Arg

1

5

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Geotrichum candidum Dec 1 (FERM BP - 7033)

<400> 3

Ile Pro Tyr Gly Pro Glu Thr Ser Asp Ala Glu Leu Ala Ser Gly Val

1

5

10

15

Thr Ala Gln Asp Arg

20

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Geotrichum candidum Dec 1 (FERM BP - 7033)

<400> 4

Ser Gly Ala Pro Ile Asp Leu Ala Pro Thr Ala Asp Asp Pro Ala Leu

1

5

10

15

Gly Ala Asp Pro Gln

20

<210> 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 6

<212> PRT

<213> Geotrichum candidum Dec 1 (FERM BP - 7033)

<400> 5

Pro Tyr Gly Pro Glu Thr

1

5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> Geotrichum candidum Dec 1 (FERM BP - 7033)

<400> 6

Pro Thr Ala Asp Asp Pro

1

5

<210> 7

<211> 498

<212> PRT

<213> Geotrichum candidum Dec 1 (FERM BP - 7033)

<400> 7

Met Arg Leu Ser Leu Phe Val Val Ser Val Ala Val Leu Val Gly Ser

1

5

10

15

Ser Ser His Val Asn Ala Ala Lys Leu Gly Ala Arg Gln Thr Arg Thr

20

25

30

Thr Pro Leu Leu Thr Asn Phe Pro Gly Gln Ala Pro Leu Pro Thr Leu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

35	40	45
Thr Gln His Thr Thr Glu Ser Gly Ala Asn Asp Thr Ile Leu Pro Leu		
50	55	60
Asn Asn Ile Gln Gly Asp Ile Leu Val Gly Met Lys Lys Gln Lys Glu		
65	70	75
Arg Phe Val Phe Phe Gln Val Asn Asp Ala Thr Ser Phe Lys Thr Ala		
85	90	95
Leu Lys Thr Tyr Val Pro Glu Arg Ile Thr Ser Ala Ala Ile Leu Ile		
100	105	110
Ser Asp Pro Ser Gln Gln Pro Leu Ala Phe Val Asn Leu Gly Phe Ser		
115	120	125
Asn Thr Gly Leu Gln Ala Leu Gly Ile Thr Asp Asp Leu Gly Asp Ala		
130	135	140
Gln Phe Pro Asp Gly Gln Phe Ala Asp Ala Ala Asn Leu Gly Asp Asp		
145	150	155
Leu Ser Gln Trp Val Ala Pro Phe Thr Gly Thr Thr Ile His Gly Val		
165	170	175
Phe Leu Ile Gly Ser Asp Gln Asp Asp Phe Leu Asp Gln Phe Thr Asp		
180	185	190
Asp Ile Ser Ser Thr Phe Gly Ser Ser Ile Thr Gln Val Gln Ala Leu		
195	200	205
Ser Gly Ser Ala Arg Pro Gly Asp Gln Ala Gly His Glu His Phe Gly		
210	215	220
Phe Leu Asp Gly Ile Ser Gln Pro Ser Val Thr Gly Trp Glu Thr Thr		
225	230	235
Val Phe Pro Gly Gln Ala Val Val Pro Pro Gly Ile Ile Leu Thr Gly		
245	250	255

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Arg Asp Gly Asp Thr Gly Thr Arg Pro Ser Trp Ala Leu Asp Gly Ser
 260 265 270
 Phe Met Ala Phe Arg His Phe Gln Gln Lys Val Pro Glu Phe Asn Ala
 275 280 285
 Tyr Thr Leu Ala Asn Ala Ile Pro Ala Asn Ser Ala Gly Asn Leu Thr
 290 295 300
 Gln Gln Glu Gly Ala Glu Phe Leu Gly Ala Arg Met Phe Gly Arg Trp
 305 310 315 320
 Lys Ser Gly Ala Pro Ile Asp Leu Ala Pro Thr Ala Asp Asp Pro Ala
 325 330 335
 Leu Gly Ala Asp Pro Gln Arg Asn Asn Asn Phe Asp Tyr Ser Asp Thr
 340 345 350
 Leu Thr Asp Glu Thr Arg Cys Pro Phe Gly Ala His Val Arg Lys Thr
 355 360 365
 Asn Pro Arg Gln Asp Leu Gly Gly Pro Val Asp Thr Phe His Ala Met
 370 375 380
 Arg Ser Ser Ile Pro Tyr Gly Pro Glu Thr Ser Asp Ala Glu Leu Ala_
 385 390 395 400
 Ser Gly Val Thr Ala Gln Asp Arg Gly Leu Leu Phe Val Glu Tyr Gln
 405 410 415
 Ser Ile Ile Gly Asn Gly Phe Arg Phe Gln Gln Ile Asn Trp Ala Asn
 420 425 430
 Asn Ala Asn Phe Pro Phe Ser Lys Pro Ile Thr Pro Gly Ile Glu Pro
 435 440 445
 Ile Ile Gly Gln Thr Thr Pro Arg Thr Val Gly Gly Leu Asp Pro Leu
 450 455 460
 Asn Gln Asn Glu Thr Phe Thr Val Pro Leu Phe Val Ile Pro Lys Gly

THIS PAGE BLANK (USPTO)

465		470		475		480									
Gly	Glu	Tyr	Phe	Phe	Leu	Pro	Ser	Ile	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Thr	Ile
				485					490					495	
Ala	Ala														
	498														

<210> 8

<211> 1494

<212> DNA

<213> *Geotrichum candidum* Dec 1 (FERM BP - 7033)

<400> 8

atg cgc ttg tgc ctg ttt gtc gtg tgc gtt gcc gta ctc gtc ggg tgc	48
agc tgc cat gtc aat gct gct aaa ctc ggc gcg aga cag acg cgt acg	96
aca ccc ctc ctc act aat ttt ccg gga caa gcc ccg ctg ccg act cta	144
acg cag cat acg act gag agc ggg gcc aac gat aca att ctg ccc ctg	192
aac aac ata caa ggc gac att ttg gtt ggc atg aag aaa cag aag gaa	240
cgc ttc gtc ttt ttc caa gtc aat gac gca acc tgc ttc aag acg gcg	288
ttg aag acc tac gtg cct gag cgc atc acg tgc gcg gcg att ttg att	336
tca gat cct tct cag cag ccg ttg gct ttc gtc aac ctc ggg ttt tgc	384
aac aca ggc ctc cag gcg ctt gga att acc gac gat ctg ggt gat gca	432
caa ttc cca gat ggt cag ttc gca gac gcc gca aac ctc ggg gac gac	480
ctc agc caa tgg gtg gcg cct ttt act ggt acc acc atc cat ggt gtc	528
ttt ctg att ggt agc gac cag gac gac ttc ttg gat cag ttc acg gat	576
gat atc tct tgc acc ttt ggt tcc tcc atc act cag gtg cag gcg ctc	624
agt ggg tct gcg cgt cca gga gat cag gct ggt cat gaa cac ttc ggg	672
ttc ctc gac ggc atc tgc cag ccc tca gtc aca ggc tgg gag acg acc	720

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gtc ttc cct gga cag gcg gtc gtc cca cct gga att atc ctc act gga	768
cgc gat ggg gac acg ggc acc cga ccg tcg tgg gct cta gat ggg agt	816
ttc atg gca ttc cgg cac ttc cag cag aag gtc ccc gaa ttc aac gcg	864
tac acg ctc gcc aac gcg ata ccc gcg aac agc gcg gga aac ctc acc	912
cag cag gaa ggt gca gag ttc ctc ggc gcg cgc atg ttc ggc cgt tgg	960
aag agc ggc gcg ccg att gac ctc gcg ccg acg gcg gac gac cca gcg	1008
ctc ggc gcc gac ccg cag agg aac aac aat ttc gat tac tca gac acg	1056
ctg acg gac gag acg cgc tgc ccc ttc ggt gca cac gtg agg aag acg	1104
aac cct cga cag gac ctg ggt gga ccg gtc gac acc ttc cac gct atg	1152
cgg tcc agt atc ccg tac ggc cca gaa acg tct gat gca gaa ctt gcg	1200
tcg ggc gtg act gcg caa gac cgc ggt ctt ctt ttc gtc gag tac cag	1248
tcc att att ggt aat ggg ttc agg ttc cag cag att aac tgg gcg aac	1296
aat gcg aac ttc cct ttc tcc aaa ccg atc acg cct gga att gag cct	1344
atc atc ggc cag acg act cca cgc act gtc ggc ggg ctc gac ccc ctc	1392
aac cag aat gag acg ttc aca gta ccg ctg ttt gtg atc ccg aag ggc	1440
ggg gaa tac ttt ttc ttg ccc tct atc tct gcg ctc act gcg act atc	1488
gct gct	1494

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01093

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C12N 15/00, C12N 9/04, C12N 1/21, C09B 67/00 // (C12N 15/00, C12R 1:645) (C12N 9/04, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19) (C12N 9/04, C12R 1:645) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C12N15/00, C12N9/04, C12N1/21, C09B67/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX PY	Seong Jun Kim et al., "Purification and characterization of a novel peroxidase from Geotrichum candidum dec 1 involved in decolorization of dyes", Applied and Environmental Microbiology (March 1999), Vol.65 ,No.3 , p.1029-1035	1, 2, 6 3-5
A	Seong Jun Kim et al., "Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus Geotrichum candidum Dec 1", Biotechnology and Bioengineering (1998), Vol.62 ,No.1 , p.114-119	1-6
A	Seong Jun Kim et al., "Characteristics of a newly isolated fungus Geotrichum candidum Dec 1 ,which decolorizes various dyes", Journal of Fermentation and Bioengineering (1995) ,Vol.79 , No.6 , p.601-607	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 May, 2000 (15.05.00)		Date of mailing of the international search report 23.05.00
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N 15/00, C12N 9/04, C12N 1/21, C09B 67/00 // (C12N 15/00, C12R 1:645)(C12N 9/04, C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:19)(C12N 9/04, C12R 1:645)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl ⁷ C12N15/00, C12N9/04, C12N1/21, C09B67/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE(STN) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX PY	Seong Jun Kim et al., "Purification and characterization of a novel peroxidase from <i>Geotrichum candidum</i> dec 1 involved in decolorization of dyes", Applied and Environmental Microbiology (March 1999), Vol.65, No.3, p.1029-1035	1, 2, 6 3-5
A	Seong Jun Kim et al., "Decolorization of molasses and a dye by a newly isolated strain of the fungus <i>Geotrichum candidum</i> Dec 1", Biotechnology and Bioengineering (1998), Vol.62, No.1, p.114-119	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 15.05.00	国際調査報告の発送日 23.05.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Seong Jun Kim et al., "Characteristics of a newly isolated fungus <i>Geotrichum candidum</i> Dec 1, which decolorizes various dyes", Journal of Fermentation and Bioengineering (1995), Vol. 79, No. 6, p. 601-607	1 - 6